

4

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-169661

(P2003-169661A)

(43) 公開日 平成15年6月17日 (2003.6.17)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 9
G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 33/48	A 4 B 0 6 3
33/48		33/53	M
33/53		33/533	

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-371937(P2001-371937)

(22) 出願日 平成13年12月5日 (2001.12.5)

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(71) 出願人 000005810

日立マクセル株式会社

大阪府茨木市丑寅1丁目1番88号

(72) 発明者 西矢 芳昭

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

(74) 代理人 100080791

弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸を分析する装置、およびそれを用いた核酸を分析する方法

(57) 【要約】

【課題】 安価であり、簡便であって、かつ微小化し得る、目的とする核酸を含有する試料から核酸を抽出精製して分析する装置および方法を提供すること。

【解決手段】 以下の (a) ~ (d) の手段を有する、試料中の核酸を分析する装置および該装置を用いた分析方法。(a) 強磁性金属酸化物およびシリカを有する磁気応答粒子に試料を接触させて、試料中の核酸と磁気応答粒子とを吸着させる処理を行う手段、(b) 磁場をかけて、前記核酸が吸着した磁気応答粒子を試料から分離する処理を行う手段、(c) 電場をかけて、核酸を磁気応答粒子から分離する処理を行う手段、(d) 前記磁気応答粒子から分離した核酸を増幅する処理を行う手段。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)～(d)の手段を有する、試料中の核酸を分析する装置。

(a) 強磁性金属酸化物およびシリカを有する磁気応答粒子に試料を接触させて、試料中の核酸と磁気応答粒子とを吸着させる処理を行う手段、

(b) 磁場をかけて、前記核酸が吸着した磁気応答粒子を試料から分離する処理を行う手段、

(c) 電場をかけて、核酸を磁気応答粒子から分離する処理を行う手段、

(d) 前記磁気応答粒子から分離した核酸を増幅する処理を行う手段。

【請求項2】 以下の(e)の手段をさらに有する、請求項1に記載の装置。(e) 前記増幅した核酸を電気泳動する処理を行う手段。

【請求項3】 前記(a)～(e)の手段によるすべての処理が1つのステージで行われるように構成されてなり、当該ステージの面積が $1\text{ cm}^2 \sim 40\text{ cm}^2$ である請求項2に記載の装置。

【請求項4】 前記ステージには、少なくとも(b)、(c)、(e)の各手段による処理が行われるための溝が形成されてなり、当該溝の幅が $5\text{ }\mu\text{m} \sim 1\text{ mm}$ である請求項3に記載の装置。

【請求項5】 前記各手段の少なくとも一つを自動的に制御し得る制御手段をさらに備える、請求項1～4のいずれかに記載の装置。

【請求項6】 ビベッティングする手段をさらに備える、請求項5に記載の装置。

【請求項7】 核酸を分取する処理を行う手段をさらに備える、請求項1～6のいずれかに記載の装置。

【請求項8】 分取した核酸のハイブリダイゼーションの処理を行う手段をさらに備える、請求項7に記載の装置。

【請求項9】 分取した核酸の吸光分光、蛍光分光または発光分光のうちの少なくとも一つの測定を行う手段をさらに備える、請求項7に記載の装置。

【請求項10】 請求項1～9のいずれかに記載の装置を用いることを特徴とする試料中の核酸の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、目的とする核酸を含有する試料中の核酸を分析する装置およびそれを用いた核酸を分析する方法に関する。

【0002】 本発明によれば、核酸の分析を小スケールで効率良くおこなうことが可能となる。すなわち、従来の方法では小型化が困難であった核酸の抽出精製装置を小型化し、安価かつ簡単な構成で核酸を分析することができる。そして、使用する試料の量が極めて僅かであっても高感度な分析を行うことが可能となる。

【0003】

【従来の技術】 核酸を含有する細胞等の生物材料からの核酸の抽出精製は、遺伝子工学や臨床診断の分野では重要なステップである。例えば、ある遺伝子について解析しようとする場合、まず、その遺伝子を保持する細胞等の生物材料からDNAやRNAといった核酸を抽出することが必要である。また、細菌やウイルスといった感染体の検出のためのDNA/RNA診断においても、血液等の生物材料から細菌やウイルスの核酸を抽出した後、検出することが必要である。

10 【0004】 一般に、生物材料に含まれるDNAやRNAといった核酸は、遊離した状態で存在するわけではなく、タンパク質、脂質、糖から構成される細胞膜や細胞壁等の殻の中に存在し、ほとんどの場合、核酸自身もタンパク質との複合体を形成している。したがって、生物材料から核酸を抽出精製する場合には、まず超音波や熱による物理的破碎処理やプロテアーゼによる酵素処理、界面活性剤や変性剤による処理等を施すことにより核酸を遊離させ、さらに、フェノール等の有機溶媒による抽出操作や超遠心分離、イオン交換体等の担体を使用したカラムクロマトグラフィー等により、破碎物中から核酸を精製する必要がある。これらの手法は、核酸や出発材料、さらには抽出した核酸の用途に応じて組み合わせられ、それぞれ最適化されて用いられている[Molecular cloning: A Laboratory manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]。

【0005】 しかし、これらの方法は遠心分離など煩雑な工程を含むため非常に手間がかかる作業である。さらに、これらの方法により抽出された核酸サンプル中には、その後の解析にとって弊害となるタンパク質などの夾雑物質が多く含まれている。そのため、純度よく核酸を得るためには、これらの抽出操作を行った後に塩化セシウム等による密度勾配を利用した超遠心分離操作やフェノール/クロロホルム抽出に代表されるような煩雑で、かつ長時間を要するタンパク質除去操作を行う必要がある。

【0006】 一方、簡便な核酸抽出法としてシリカを核酸結合性固相担体として使用する方法がある(特開平2-289596号公報)。この方法は、バクテリアなどの生物材料から核酸を一段階で抽出することが可能なおえ、溶出液として水またはTEバッファーなど低濃度の緩衝液を使用するため、特別な脱塩濃縮操作が不要で、抽出した核酸を直ちに後の解析に使用することができるという利点がある。しかしながら、本方法によりシリカから溶出させて得られた核酸は濃度が低く、収量においても満足できるものではなかった。従って、少量の核酸で分析が可能なポリメラーゼ・チェイン・リアクション(PCR)などには通常のスケールで適用できるが、サザンハイブリダイゼーションやノーザン・ブロットなどの分析には大スケール化とその後の濃縮工程という煩雑な操作を必要とした。更に簡便性を高めた核酸抽出方法

として核酸結合用磁性担体を使用する核酸単離方法があり、例えば核酸が共有結合し得る重合性シラン被膜により覆われた超常磁性酸化鉄核を有する磁気応答粒子を利用することが知られている（特開昭60-1564号公報）。しかしながら、本方法も溶出させて得られた核酸の濃度、収量における不満を解消できるものではなかった。

【0007】また、診断分野への用途に際しては、分析のスケールを微小化して、微量サンプルでの核酸分析が可能であることが求められる。しかし、従来の方法では、十分な量の核酸を得るには大スケール化が必要となる関係から、装置の微小化が困難である。さらに現在に至るまで、 40 cm^2 以下の面積のステージ上、いわゆるチップ上に核酸の抽出精製工程を含む全核酸分析工程を載せ得るシステムは開発されていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】このような理由から、簡便に効率良く核酸を抽出精製し分析することができる装置・方法が求められていた。簡便性を高めるためには、核酸抽出精製および分析の一連の操作を一体化し、連動させ得るシステムを開発することが必要となる。さらに、スケールを微小化することで微量サンプルの核酸分析が可能となり、診断分野に用いることが可能となる。すなわち本発明の目的は、核酸を含有する試料から簡便に核酸を抽出精製して、分析するための装置および方法を提供することである。さらには、核酸の抽出精製から分析までの微小化可能なトータルシステム、いわゆる微小化TAS（トータル・アナリシス・システム）を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、強磁性金属酸化物およびシリカを有する磁気応答粒子を用い、適宜、磁場・電場をかけることで、非常に効率良く核酸を精製することができることを見出した。この知見に基づくことで、核酸分析の段階を含めた装置を小型化でき、核酸の分析を簡便におこなうことができ、さらに核酸分析の微小化TASを提供し得る、本発明を完成した。

【0010】磁気応答性のないシリカを核酸結合性固相担体として使用する従来の方法では、核酸の抽出精製に十分な量の担体が必要である。このため、従来の方法ではシステムの微小化は困難である。さらに従来の方法によるシステムを自動化する場合には、核酸が結合した担体の攪拌、分離、移動の諸動作のためにピペット操作が要求される。したがって、ピペット操作をおこなうロボットアームを有する大掛かりな装置を必要とするため、システムの微小化はさらに困難であった。本発明者らが見出した強磁性金属酸化物およびシリカを有する磁気応答粒子を用いる方法では、磁場を利用することにより簡便かつ安価に攪拌、分離、移動の諸動作をおこなうことができ、微小化が容易となった。したがって、本発明の

方法によれば、従来の方法では小型化が困難であった核酸の抽出精製工程を小型化し、安価かつ簡単な構成で核酸を分析することができる。そして、使用する試料の量が極めて僅かであっても高感度な分析が可能となる。また、システムの自動化のためにピペティング手段を設ける場合であっても、核酸の単離等の手段が微小化されるため、システム全体としては比較的微小化が図れることが期待される。

【0011】また、これまでシリカを有する磁気応答粒子に結合あるいは吸着している核酸は所定のバッファや水によりほとんど全てが溶出すると考えられてきたため、核酸の収量が低い理由は磁気応答粒子の核酸結合能が低いことによるものと思われていた。従って、磁気応答粒子の材質、粒形、表面積などに種々の改良が施されてきた（特開平2-289596号公報、特公平7-13077号公報、特開平9-12929号公報）。しかしながら、種々の検討をおこなった結果、本発明者らは、核酸結合用担体として強磁性金属酸化物およびシリカを有する磁気応答粒子を用いた場合に、磁気応答粒子に結合あるいは吸着している核酸の状態によっては所定のバッファや水によっても溶出が困難であることを見いだした。そこで、核酸がリン酸結合骨格を有するため負の電荷を持つことを利用し、磁気応答粒子を含む系を電場におくことで、磁気応答粒子から核酸を高収率で遊離することが可能となり、核酸分析の微小化TASを構築することが可能となることが分かった。

【0012】すなわち本発明は、以下の構成からなる。

(1) 以下の(a)～(d)の手段を有する、試料中の核酸を分析する装置。

(a) 強磁性金属酸化物およびシリカを有する磁気応答粒子に核酸を接触させて、試料中の核酸と磁気応答粒子とを吸着させる処理を行う手段、

(b) 磁場をかけて、前記核酸が吸着した磁気応答粒子を試料から分離する処理を行う手段、

(c) 電場をかけて、核酸を磁気応答粒子から分離する処理を行う手段、

(d) 前記磁気応答粒子から分離した核酸を増幅する処理を行う手段。

(2) 以下の(e)の手段をさらに有する、(1)に記載の装置。

(e) 前記増幅した核酸を電気泳動する処理を行う手段。

(3) 前記(a)～(e)の手段によるすべての処理が1つのステージで行われるように構成されてなり、当該ステージの面積が $1\text{ cm}^2 \sim 40\text{ cm}^2$ である(2)に記載の装置。

(4) 前記ステージには、少なくとも(b)、(c)、(e)の各手段による処理が行われるための溝が形成されてなり、当該溝の幅が、 $5\text{ }\mu\text{m} \sim 1\text{ mm}$ である(3)に記載の装置。

(5) 前記各手段の少なくとも一つを自動的に制御し得る制御手段をさらに備える、(1)～(4)のいずれかに記載の装置。

(6) ビベッティングする手段をさらに備える、(5)に記載の装置。

(7) 核酸を分取する処理を行う手段をさらに備える、(1)～(6)のいずれかに記載の装置。

(8) 分取した核酸のハイブリダイゼーションの処理を行う手段をさらに備える、(7)に記載の装置。

(9) 分取した核酸の吸光分光、蛍光分光または発光分光のうちの少なくとも一つの測定を行う手段をさらに備える、(7)に記載の装置。

(10) (1)～(9)のいずれかに記載の装置を用いることを特徴とする試料中の核酸の分析方法。

【0013】

【発明の実施の形態】本明細書において、核酸を分析するとは、核酸を精製して増幅する、核酸を電気泳動の処理に供する、特定の核酸を分取する、ハイブリダイゼーションを行う、各種分光法による測定を行うことを含む概念である。

【0014】本発明は、前記(a)～(d)の手段を備えることを特徴とする。以下、(a)～(d)の各手段を順に説明する。なお、以下の説明では、本発明のさらに好ましい態様(「ステージ」、「溝」、「自動化手段」等)も説明するが、それらは、本発明(請求項1に記載の発明)に必須の構成要件ではなく、(a)～

(d)の手段を有することにより、試料から核酸を容易に単離できるようになり、装置の微小化に寄与し得るという効果を奏する。

【0015】本発明に係る装置の手段(a)、すなわち磁気応答粒子に核酸を接触させて、両者を吸着させる処理を行う手段としては、特別な機器等は必要なく、単に両者を混合し得る領域(以下、「反応室」ともいう)があればよい。両者を接触させるための条件については特に問わないが、核酸や磁気応答粒子の性状を損なわない緩やかな条件であることが好ましく、単に両者を共存させるだけでもよい。手段(a)の処理により、試料中の核酸は磁気応答粒子に吸着する。

【0016】手段(b)は、手段(a)によって核酸が吸着した磁気応答粒子に磁場をかけて、両者を移動させることにより、核酸を試料から分離する処理を行う手段である。核酸が結合した磁気応答粒子を分離、移動させるために、磁場をかける手段としては、永久磁石を用いる方法や電磁石による方法が考えられるが、磁気応答粒子を感応させるに十分な磁力を有する必要がある。例えば、磁束密度が約3.00ガウスの磁石が用いられ得る。このように、磁気応答粒子を核酸の担体とすることで、磁場の制御によって、核酸を攪拌、分離、移動させることができ、装置の大型化の原因となるビベットを用いる工程を減らすことになるので、装置の微小化に貢献し得

る。

【0017】手段(c)は、電場をかけることにより、磁気応答粒子から核酸を遊離させ、分離する手段である。電場をかける条件は、核酸や磁気応答粒子の性状を損なわない緩やかな条件であることが好ましい。例えば、電解質溶液により浸漬された流路に10～200V程度の電圧で通電することにより、核酸のみを正極方向に移動させることで磁気応答粒子と核酸とを分離し、精製された核酸を得ることができる。あるいは、電解質溶液に浸漬したゲルマトリックス中の溝に核酸が結合した磁気応答粒子を注入し、ゲルマトリックスに10～200V程度の電圧で通電することにより、固相担体はゲルマトリックス内を移動せず核酸のみを正極方向に移動させることで磁気応答粒子と核酸とを分離し、精製された核酸を得ることができる。また、適当な孔を有するメンブレンを利用することもできる。すなわち、核酸が結合した磁気応答粒子を含む液をメンブレンで覆い、適当な電圧で通電することにより、磁気応答粒子から核酸が遊離するので、精製された核酸を回収することができる。このように、電場を利用することで、単に水やバッファに溶出させるだけの場合に比べ、より高収率で磁気応答粒子から核酸を遊離させることができ、微小量分析の実現に貢献し得る。

【0018】磁気応答粒子を含む系に電場をかけるためのデバイスとしては、何ら特別な機器を必要としない。例えば、核酸やタンパク質を分離分析するための市販の電気泳動装置やパワーサプライをそのまま用いることができる。しかしながら、本発明による核酸の抽出精製を機能的におこなうためには、分注機構、電極、固液分離手段を備えた自動化装置が有用になると考えられる。これらの手段を備えた自動化装置の作製は、従来技術により十分可能であり、該自動化装置もまた本発明の実施の一態様である。

【0019】以上の手段による処理に供することで試料中の核酸が精製され得る。精製した核酸は、必要に応じて収納のための領域(以下、「回収室」という)に収納した後、以下の手段による処理に供される。以上、手段(a)～手段(c)の処理を行う領域および(存在する場合)は回収室を総称して、「核酸精製部」という。手段(a)～手段(c)の各処理は、各々異なる領域で行ってもよいが、装置の省スペース化を図る観点から、なるべく少ない領域を共用するのが好ましい。例えば3～10本程度の流路を手段(a)～手段(c)の各処理を行う領域とし、各手段の必要に応じて、磁場、電場をかけることで、領域を共用できる。

【0020】核酸を増幅する処理を行う手段(手段(d)、以下、「核酸増幅部」ともいう)は、少なくとも、精製した核酸が存在するスペースがあればよいが、ポリメラーゼと基質およびバッファなどを試薬として加え、好適な反応温度を与えることが好ましい。ベルチ

エ素子による温度管理は反応を飛躍的に向上させるのでより好ましい。

【0021】以上の各手段により試料中の核酸を精製して増幅することができる。本発明のより好ましい態様として、さらに、上述のように増幅した核酸を電気泳動する手段(手段(e))を有する装置を挙げることができる。手段(e)を行う領域を以下、「分析部」という。分析部の溝(流路)は、一般的なキャピラリー電気泳動のために必要な幅、好ましくは $5\mu\text{m}\sim 1\text{mm}$ 、さらに好ましくは $5\sim 200\mu\text{m}$ の幅の流路が例示される。手段(e)には、核酸の検出のためのデバイスとして励起光を発生する発光ダイオードなどの光源やCCDカメラなどが組み合わされ得る。電気泳動の際に流路に電場をかけるためのデバイスは、磁気応答粒子を含む系に電場をかけるためのデバイスを併用してもよいし、別途核酸やタンパク質を分離分析するための市販の電気泳動装置やパワーサプライを用いてもよい。いずれにせよ、何ら特別な機器を必要としない。

【0022】以上の手段を有する装置により、試料中の核酸を簡便な操作で、効率よく単離することができる。このように単離した核酸のうち、特定の核酸のハイブリダイゼーションや吸光、蛍光或いは発光による測定・検出を行うこと等を目的として、核酸の分取のための手段(以下、「分取部」という)を備えた装置もまた、本発明の実施の一態様である。分取部の形状には特に制限はなく、例えば、分析部と同様の形状で何ら問題無い。例えば、分取部を、分析部の流路と交差させることにより目的のサイズの核酸のみを分取することができる。また、分析部の流路と分取部の流路とは、同一の流路を共用してもよい。

【0023】本発明においては、上記(a)～(e)の手段によるすべての処理は、1つのステージで行われるように構成することができ、そのように構成された装置は、本発明の好ましい態様の一つである。さらに、該ステージの面積が $1\text{cm}^2\sim 40\text{cm}^2$ であることにより、核酸の抽出精製から分析までの微小化TASが提供されるので、より好ましい。

【0024】さらに、該ステージには前記(b)、(c)、(e)の各手段による処理が行われるための溝(流路)が形成されており、当該溝の幅が $5\mu\text{m}\sim 1\text{mm}$ であることが、装置の微小化の観点から好ましい。また、該ステージの材質は、ガラスやポリプロピレン、ポリカーボネートなどの一般的なプラスチック、或いは耐熱性樹脂等の公知のあるいは新規な高分子素材等を使用することができる。ステージ各部のパターンの加工は、公知の方法によればよいが、その表面加工精度が磁気応答粒子の攪拌、分離、移動などに重要な影響を与えるので、例えば、射出成型法、ガラスモールディング法、ドライエッチング法、レーザーカッティング法、2P法などによる方法が好ましい。

【0025】さらに、上記装置の各手段の少なくとも一つを自動的に制御し得る制御手段を設けることで、核酸の抽出精製から分析・分取までの工程の一部または全部を自動化することも可能になる。また、上記装置にさらにビベッティングする手段を設けてサンプルを上記各手段間で輸送等することにより、分析・分取を連続的に行うことが可能となる。ビベッティングする手段を設けることで装置の若干の大型化は避けられないが、本発明の装置は上述のように比較的微小であるので、ビベッティングする手段を設けても、従来の装置に比べれば、全体としては微小化を図ることができる。本発明の実施において、ビベッティングする手段および制御手段は特に制限を受けることはなく、通常用いられるものを使用することができる。

【0026】本装置には、分取部にて分取した特定の核酸を各種分光法にて測定したり、ハイブリダイゼーションの処理を行ったりする手段をさらに有していてもよい。これらの手段を有することにより、核酸の精製から測定、ハイブリダイゼーションまでの工程の一つの装置で行うことができるようになる。分光法としては、核酸の分析に有用な任意の分光法を採用することができ、例えば、吸光分光、蛍光分光あるいは発光分光を挙げることができる。ハイブリダイゼーションの処理を行う手段も、当業界において通常用いられている手段を用いることができる。

【0027】本発明において使用する強磁性金属酸化物およびシリカを有する磁気応答粒子のより具体的な例には、マグネタイト、 γ -酸化鉄、マンガン亜鉛フェライトなどの強磁性金属酸化物をシリカで被覆したもの、これらの強磁性酸化物をシリカ中に分散させた粒子などを挙げることができる。

【0028】本発明において使用する核酸を含有する試料は、蛋白質、生体膜、DNAまたはRNA、低分子量核酸などを含む生物材料である。このような生物材料としては、それらを含む血液、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、酵母、動物組織、植物組織、バクテリオファージ、ウイルス、細菌あるいはこれらの組み合わせが例示される。また、精製する目的のために、この生体物質がプラスミドまたは増幅産物中の核酸であってもよい。

【0029】本発明の(a)～(c)の各手段において使用される核酸抽出精製用溶液としては、カオトロピック物質、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)、トリス塩酸などを含有するバッファーが挙げられる。カオトロピックイオンの存在下で、核酸はシリカ粒子等の担体に特異的に吸着し、他の細胞成分と分離される。カオトロピック物質としては、グアニジン塩、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、(イソ)チオシアン酸ナトリウム、尿素などが例示される。それらは組合せて使用してもよい。その濃度は、約 $1\sim 10\text{mol/l}$ 程度が好ましい。本発明における好ましい核酸抽出精製用溶液には、

例えば、グアニジンチオシアン酸塩、Triton X-100、トリス/塩酸緩衝液が含まれる。さらに、核酸が結合した磁気応答粒子を、例えば約70%エタノールで数回洗浄した後、担体を乾燥し、その後滅菌水やTE緩衝液などの低イオン濃度の溶液を添加することにより、精製された核酸の純度向上や磁気応答粒子からの核酸の遊離に対し好ましい結果を与える。

【0030】本発明における手段(c)では、核酸を最終的に遊離し回収するために、例えば、TE緩衝液、滅菌水などの遊離用緩衝液が用いられ得る。

【0031】本発明の一態様は、簡便に効率良く核酸を抽出精製し分析することができる方法である。また、本発明の一態様は、核酸抽出精製および分析の一連の操作を一体化し、連動させ得るシステムである。さらに、本発明の別な態様は、核酸の抽出精製から分析までの微小化可能なトータルシステムである。

【0032】本発明により、今までの技術では困難であった核酸を抽出精製し分析するための微小化されたシステムが可能となり得る。また、遺伝子診断分野において用いることが可能となる。

【0033】上記の説明においては、主にDNAの分析を主眼にしていたが、本発明の核酸の分析方法はRNAについても同様に適用することができる。この場合は核酸増幅部(手段(d))においてRNAを逆転写反応をおこなってターゲットDNAやプローブDNAを形成すればよい。

【0034】以下、図面を用いて、本発明の実施の態様についてさらに詳細に説明するが、本発明は、これに限定されるものではない。図1は、本発明の実施の一態様である。

【0035】生物材料等の試料は核酸精製部Aにおいて精製され、核酸が回収される。核酸精製部Aは、反応室および/または回収室になり得る複数の直径約6mmの半球状の窪み(以下、単に「半球」という)1、および、上記各半球間を結んでおり磁場および/または電場をかけることができる幅約900 μ mの流路2~4からなる。半球1間を結合させるルートについては特に制約はないが、半球1が互いに直線状に結ばれていることが好ましい。

【0036】まず半球1で、核酸を強磁性金属酸化物およびシリカを有する磁気応答粒子に吸着させる(反応室としての使用)。すなわち、半球1において、手段(a)の処理がなされる。次に、半球1から流路3を経由して、核酸が吸着した磁気応答粒子を磁場により隣の半球に移動させ、該粒子を試料から分離する。すなわち、手段(b)による処理がなされたことになる。次に、その半球において、該粒子に、上述した核酸を溶出させるための試薬をビベティングやバルブディス Pens等を用いて加える。さらに、電場をかけることにより核酸を遊離させる。次に、そこから流路4を経由して、

核酸を電場により隣の半球に移動させ、核酸のみを分離し収納する(回収室としての使用)。これにより、手段(c)による処理がなされる。

【0037】核酸精製部Aにおいて、各手段による処理をどの半球・流路において行うかは特に制限されない。また、必要に応じて新たに緩衝液やエタノールその他の有機溶媒による洗浄といった工程を加えることもできる。また、必要に応じ、同時に2つ以上の試料を処理したり、同一の試料を2つ以上に分けて処理するなど、複数の工程を同時に進めてもよい。そしてこの際、各サンプルに使用する半球・流路を他のサンプルのものと分けるために、流路にしきりを設けてもよい。また、試料を移動させる際、全ての移動において磁場・電場を用いる必要はなく、一部においてはビベティング等の公知の手段を用いても差し支えない。

【0038】核酸精製部Aで精製され回収された核酸は、核酸増幅部Bに移され、そこで増幅される。すなわち、手段(d)による処理が行われる。核酸増幅部Bは直径約6mmの半球5である。この半球5は、磁場および/または電場をかけることができる幅約900 μ mの流路6を介して、核酸精製部Aの半球と接続している。核酸精製部Aから核酸増幅部Bへの移動は、電場を利用できるのは勿論、必要に応じ、ビベティング等他の公知の方法を利用して差し支えない。核酸増幅部Bの半球5で、PCR法など公知の方法により、精製された核酸が増幅される。

【0039】核酸増幅部Bは、さらに電場をかけることができる幅約100 μ mの流路8を介して、核酸を電気泳動するための分析部C1、および/または、核酸の分取のための分取部(図1にはなく、図2の符号C2)に接続していることが好ましい。この構成により、分析および/または分取への移行に電場を利用することができる。あるいは、別途、核酸増幅部B(すなわち半球5)を設けずに、核酸精製部Aで精製され回収された核酸を、移動させずにそのまま回収室で増幅したのち、分析部、および/または、分取部に移動させることも可能である。つまり、手段(d)の処理を手段(a)~(c)の処理を行う半球、流路にて行うことも可能である、ということである。また、同時に2つ以上の試料を処理したり、同一の試料を2つ以上に分けて処理するなど、複数の工程を同時に進めてもよい。

【0040】図1に示すように、分析部C1では、増幅した核酸の電気泳動が行われる(手段(e)の処理)。分析部C1は、電気泳動のための幅約100 μ mの流路7からなる。流路7と核酸増幅部B(すなわち半球5)とは、電場を利用して核酸を移動させるための幅約100 μ mの流路8を介して接続されている。増幅した核酸は流路8を経て、流路7との交差点分まで移されることにより、電気泳動への移行がスムーズに行えるように構成されている。

【0041】図2もまた本発明に係る装置の一例を示すものである。この図における符号C2は核酸の分取を行うための流路8を有する分取部である。増幅された核酸は流路8を介してその末端まで移動したのち分取される。本例のように、増幅（すなわち手段（d）による処理）後、電気泳動をせずに、ただちに分取を行う装置も本発明の一態様である。分取部C2の流路8の幅は約100μmである。

【0042】図3も本発明に係る装置の一例を示す。本装置においては分析部C1と分取部C2とを組合わせている。本実施態様における核酸の抽出精製方法や増幅方法は、前述の実施態様における方法と同様であるので、その詳細な説明を省略する。増幅された核酸は流路8を経由して流路7との交差点まで移される。その後、電気泳動に供され（手段（e）による処理）、ついで、電気泳動により分離された核酸が、流路7と適当な位置で交差している別の流路9まで移動したとき、流路9に流れる方向に電場をかけることにより、特定のサイズの核酸を分取することができる。このように分取された核酸は、ハイブリダイゼーションや吸光分光、蛍光分光或いは発光分光による測定が行われ得る。あるいは、核酸を増幅した（手段（d）による処理がなされた）後に、電気泳動を経ずに分取してもよい。あるいは、増幅した核酸を電気泳動に供した後、特定のサイズの核酸を分取してもよい。

【0043】核酸精製部A・核酸増幅部B・分析部C1および／または分取部C2は、縦95mm、横38mmのプレート（ステージ）に収まる。そして、プレート下部に磁場発生源とその可動用デバイス10、電場を発生させるためのパワーサプライ11および分析部における検出のためのCCD装置12を有し、上部に核酸の蛍光検出のための励起光発生源（LED）13を有している。さらに、符号14はCCD装置12からの出力信号を処理し画像出力することができるコンピュータなどの画像出力兼制御装置であり、磁場発生源とその可動用デバイス10およびパワーサプライ11の制御もおこな得る。

【0044】

【発明の効果】本発明により、従来の技術では困難であ

った、簡便に効率良く核酸を抽出精製し分析することができる装置・方法を提供することが可能となる。これにより、該装置のスケールを微小化することで微量サンプルの核酸分析が可能となり、診断分野において用いることが可能となる。さらには、本方法の優位性を活かして核酸の抽出精製から分析までの微小化可能なトータルシステム、いわゆる微小化TAS（トータル・アナリシス・システム）を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の核酸の分析方法として、核酸の抽出精製、核酸の増幅および核酸の電気泳動による分析を実施する装置の全体構成を概略的に示す。

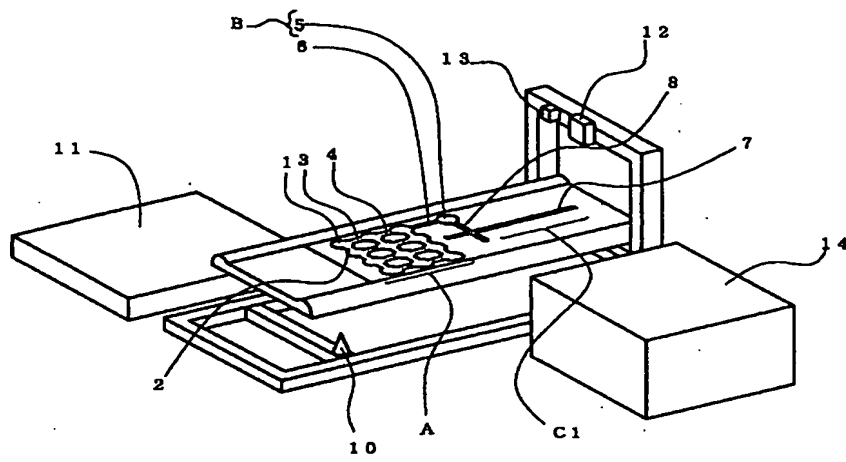
【図2】本発明の核酸の分析方法として、核酸の抽出精製、核酸の増幅および核酸の分取を実施する装置の全体構成を概略的に示す。

【図3】本発明の核酸の分析方法として、核酸の抽出精製、核酸の増幅、核酸の電気泳動による分析および核酸の分析のための分取を実施する装置の全体構成を概略的に示す。

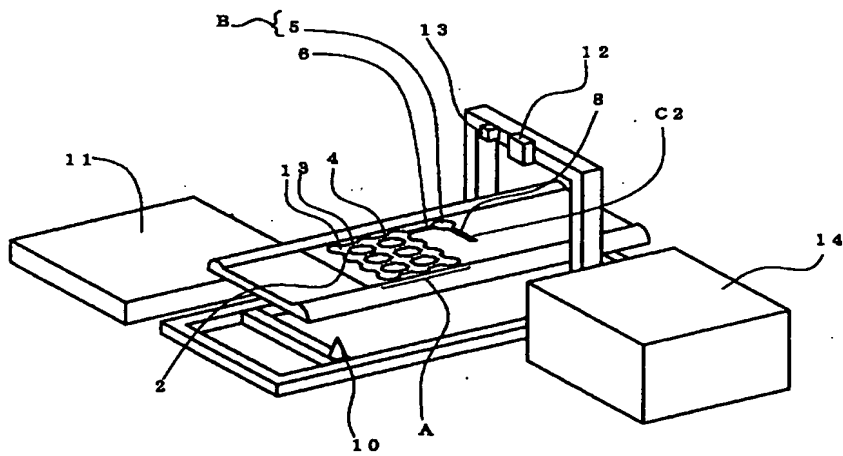
【符号の説明】

- A…核酸精製部
- B…核酸増幅部
- C1…分析部
- C2…分取部
- 1…半球状の窪み（「半球」）
- 2…流路
- 3…流路
- 4…流路
- 5…半球状の窪み（「半球」）
- 6…流路
- 7…流路
- 8…流路
- 9…流路
- 10…磁場発生源とその可動用デバイス
- 11…パワーサプライ
- 12…CCD装置
- 13…励起光発生源
- 14…画像出力兼制御装置

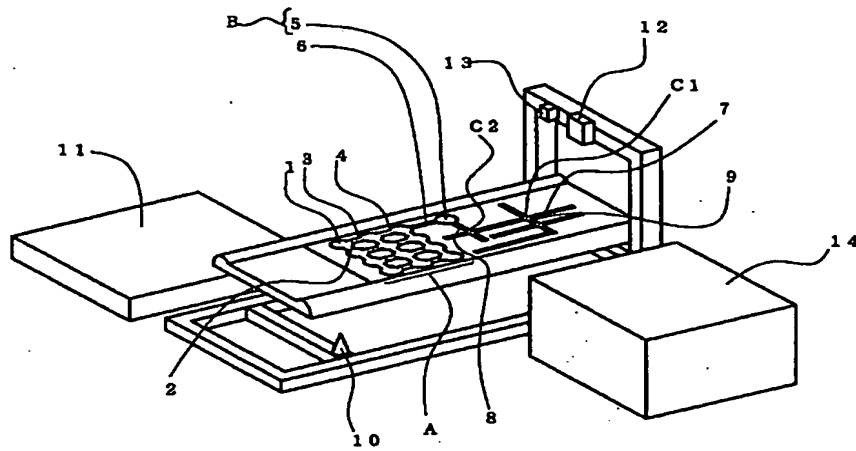
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/533
33/566
37/00

識別記号

1 0 1

F I

G 0 1 N 33/566
37/00
27/26

テーマコード(参考)

1 0 1
3 1 5 K
3 2 5 B

(72)発明者 池田 勝徳

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 岸本 幹雄

大阪府茨木市丑寅一丁目1番88号 日立マ
クセル株式会社内

(72)発明者 梅林 信弘

大阪府茨木市丑寅一丁目1番88号 日立マ
クセル株式会社内

Fターム(参考) 2G045 BA11 BA13 BB03 BB50 CA25

CB01 CB21 DA12 DA13 DA14

FA19 FA36 FB02 FB05 FB12

FB13 GC10 JA01 JA07

4B029 AA07 AA23 BB20 CC01 FA12

4B063 QA01 QA12 QA13 QQ42 QR32

QR55 QS34 QS36 QX02